

氏名	た なべ よし ただ 田 邊 嘉 直
学位の種類	博士（再生医科学）
学位記番号	甲第7号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Analyses to clarify rich fractions in hepatic progenitor cells from human umbilical cord blood and cell fusion (ヒト臍帯血の肝前駆細胞の豊富な分画の同定と細胞融合の検討)
学位論文審査委員	(主査) 押村光雄 (副査) 寺川直樹 汐田剛史

学位論文の内容の要旨

ヒト臍帯血細胞は造血幹細胞をはじめ多種類の幹細胞を含有しており、肝前駆細胞を含むと報告されている。しかしながら、肝細胞への分化ポテンシャルの高い細胞分画は不明である。一方、骨髄細胞を肝臓へ移植した際の骨髄細胞の肝細胞化は、分化転換ではなく細胞融合であるとの報告がある。今回、臍帯血各分画の肝細胞への分化ポテンシャルと細胞融合について検討した。

方法

インフォームドコンセントを得た妊婦の正常満期分娩後に、臍帯血を採取した。臍帯血は有核細胞を分離後 CD3 陽性細胞を除去し、セルソーターにより CD34、CD38、c-kit の各マーカーにより分画した。分画した細胞は、8-10 週齢の NOD/SCID マウスにレトロウイルスを 2 回投与し、四塩化炭素を腹腔内投与した 2 日後に、抗アジアロ GM1 抗体と同時に経脾経門脈性に投与し、1 ヶ月後、3 ヶ月後のマウス肝でヒト特異的アルブミン mRNA 発現を検討した。臍帯血細胞のアルブミン mRNA 発現は、1. CD34 陽性対 CD34 陰性、2. CD34 陽性 CD38 陽性対 CD34 陽性 CD38 陰性、3. CD34 陽性 CD38 陽性 c-kit 陽性対 CD34 陽性 CD38 陽性 c-kit 陰性、4. CD34 陽性 CD38 陰性 c-kit 陽性対 CD34 陽性 CD38 陰性 c-kit 陰性、の分画で比較検討した。また CD34 陽性細胞移植 1 ヶ月後に、ヒト特異的 X 染色体とマウス特異的 X 染色体による FISH 法にて細胞融合について検討した。更にヒトアルブミンとヒト肝細胞抗原を免疫組織化学染色を行い検討した。

結果

CD34 陽性細胞移植 1 ヶ月後には、3 頭/5 頭でヒトアルブミン mRNA が発現し、うち 2 頭で強い発現を認めた。一方、CD34 陰性細胞では 1 頭でヒトアルブミン mRNA 発現を認めたが、

発現レベルは低かった。また、3ヵ月後では CD34 陽性細胞移植群では 5 頭/5 頭にヒトアルブミン mRNA 発現を認め、うち 3 頭で強い発現を認めたが、CD34 陰性細胞移植群では殆ど認めなかった。CD34 陽性 CD38 陽性細胞移植群は、1ヵ月後の解析では 4 頭/5 頭にヒトアルブミン mRNA 発現が陽性であったが、CD34 陽性 CD38 陰性細胞移植群では全く発現を認めなかった。移植 3ヵ月後では、CD34 陽性 CD38 陽性細胞移植群では、2 頭/5 頭にアルブミン mRNA 発現を認めたが、CD34 陽性 CD38 陰性細胞移植群では 5 頭/5 頭すべてにヒトアルブミン mRNA 発現を認めた。すなわち、1ヵ月後と 3ヵ月後では逆の結果になる傾向を認めた。CD34 陽性 CD38 陽性 c-kit 陽性細胞移植群と CD34 陽性 CD38 陽性 c-kit 陰性細胞移植群、CD34 陽性 CD38 陰性 c-kit 陽性細胞移植群と CD34 陽性 CD38 陰性 c-kit 陰性細胞移植群では差を認めなかった。それぞれ 3 回の実験を繰り返したが、同様の結果であった。

FISH 法ではヒト X 染色体を持つ細胞を 1.2% 認め、そのうち核内にマウス X 染色体も同時に認め、細胞融合が 0.9% の細胞で起こっていると推定された。一方ヒト X 染色体のみを持つ細胞を 0.3% に認め、これらの細胞はヒトアルブミン発現を認めたことより臍帯血細胞から肝細胞へ分化したと推定された。従って分化転換と細胞融合は、1:3 の比率で起こっていると推察された。ヒトアルブミン抗体による免疫組織染色では分化転換細胞、融合細胞ともにヒトアルブミン発現を認めた。

考 察

CD34 陽性細胞と CD34 陰性細胞の比較では 1ヵ月後、3ヵ月後ともに CD34 陽性細胞でアルブミン mRNA を多く認めたことより、CD34 陽性細胞は CD34 陰性細胞より多くの肝前駆細胞を含むことが推察される。CD34 陽性細胞のうち、CD38 陽性細胞と CD38 陰性細胞の比較では移植 1ヵ月後では CD34 陽性 CD38 陽性細胞でヒトアルブミン mRNA 発現を頻度高く認めたが、3ヵ月後には CD34 陽性 CD38 陰性細胞でより頻度高く強くヒトアルブミン mRNA 発現を認めた。したがって、CD34 陽性 CD38 陰性細胞は、CD34 陽性 CD38 陽性細胞より未熟な細胞であると推定された。CD34 陽性 CD38 陽性 c-kit 陽性細胞移植群と CD34 陽性 CD38 陽性 c-kit 陰性細胞移植群、CD34 陽性 CD38 陰性 c-kit 陽性細胞移植群と CD34 陽性 CD38 陰性 c-kit 陰性細胞移植群ではアルブミン mRNA 発現に差がないことより、c-kit はヒト臍帯血細胞の肝前駆細胞の分画には有用ではないと思われた。

FISH 法では 0.9% の細胞で細胞融合を認め、0.3% の細胞で分化転換を認めた。よってヒト臍帯血細胞とマウス肝細胞のキメラの頻度は高く、しかもヒト臍帯血細胞の肝細胞への分化転換も存在していると言える。また融合した肝細胞はヒトアルブミンを発現したことより正常細胞と同様の機能を持つ可能性がある。臍帯血細胞は、種々の幹細胞を有しており、骨髄細胞に比較して多くの利点を持っている。再生医療のセルソースとして今後更なる検討が必要である。

結 語

臍帯血 CD34 陽性細胞は、アルブミン mRNA 陽性細胞に転換したことより肝前駆細胞を多数

含有していると推定される。臍帯血細胞の肝細胞化には、分化転換と細胞融合の両者が関与している。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は臍帯血細胞を抗 CD34 抗体, 抗 CD38 抗体, 抗 c-kit 抗体により分画後、NOD/SCID マウスに経脾経門脈性に投与し、投与 1 ヶ月後と投与 3 ヶ月後のマウス肝臓の解析より肝前駆細胞分画の同定を行い、更に FISH 法により細胞融合の有無を検討したものである。その結果、CD34 陽性細胞は肝幹細胞を多く含有することが判明した。更に臍帯血細胞の肝細胞化には分化転換と細胞融合の両者が関与していることが判明した。このことは、臍帯血幹細胞より肝細胞への分化に関する知見を深め、臍帯血細胞を利用した再生医療に寄与するものと考えられ、明らかに学術水準を高めたものと認める。